

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 00/5205



REC'D 19 JUL 2000

WIPO PCT

4

Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Die Merck Patent GmbH in Darmstadt/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Miniaturisiertes Analysensystem mit Vorrichtung zum Ausschleusen von Substanzen"

am 16. Juni 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 27/416 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 23. Dezember 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag



Aktenzeichen: 199 27 535.1

Wehner

**Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung
64271 Darmstadt**

**Miniaturisiertes Analysensystem mit
Vorrichtung zum Ausschleusen von Substanzen**

Miniaturisiertes Analysensystem mit Vorrichtung zum Ausschleusen von Substanzen

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum Ausschleusen definierter
5 Fraktionen von Proben nach einer präparativen oder analytischen
Flüssigphasentrennung in planaren, miniaturisierten Analysensystemen aus
dem Trennkanal in einen weiteren Kanal bzw. in eine weitere analytische
Vorrichtung.

10 Planare, miniaturisierte Analysensysteme bestehen aus Bauteilen mit
eingearbeiteten Kanälen, in denen der Transport und/oder die Auftrennung
gelöster Analyte beispielsweise mittels Kapillarelektrophorese oder
Isotachophorese erfolgt. Ein derartiges Kanalsystem kann Y-förmige
Verzweigungen und/oder X-förmige Kreuzungen (siehe Abbildung 1)
15 aufweisen. Dabei sind die Winkel zwischen den Kanälen frei wählbar.

Für das Einschleusen von Probenmaterial wird üblicherweise eine X-
förmige Anordnung der Kanäle benutzt, zum Ausschleusen eine Y-
Verzweigung. Die Probenbestandteile werden dazu durch Anlegen einer
20 Spannung an den Enden der Kanäle elektrokinetisch transportiert. Bei Y-
verzweigten Kanälen kann beispielsweise der elektrokinetische Transport
umgelenkt werden, wenn die elektrischen Potentiale von dem einen Kanal
auf den anderen abzweigenden Kanal geschaltet werden. Auf diese Weise
kann eine Fraktion einer Probe durch den abzweigenden Kanal
25 ausgeschleust werden.

Die Steuerung derartiger Ausschleusevorgänge erfolgt entweder zeitlich
definiert oder aktiv gesteuert bei vorheriger Durchgangsanalyse. Bei der
zeitgesteuerten Ausschleusung wird sowohl die exakte Kenntnis des
30 Elektropherogramms als auch eine exakte Reproduzierbarkeit des Trenn-
vorgangs vorausgesetzt. Der zu isolierende Analyt kann also nur aus einer
bekannten Probe nach vorhergehender experimenteller Bestimmung seiner

Trennzeit ausgeschleust werden. Besonders für die Kapillarelektrophorese ist dieses Verfahren ungeeignet, da es durch Anlagerung von oberflächen-aktiven Substanzen zu einer Veränderung des Zeta-Potentials an den Kanalwänden kommt. Dadurch tritt eine Modulation der elektroosmotischen Kraft und somit auch eine Modulation des zeitlichen Musters des Elektropherogramms auf. Aus diesem Grund wird eine zeitgesteuerte Ausschleusung meist nur zur Kontrolle oder Bestätigung durchgeführt.

Wesentlich genauer ist eine Ausschleusung der Analyte nach vorangegangener direkter Analyse. Von F. von Heeren et al. (Anal. Chem 68(13) (1996), 2044-2053) wird die aktiv gesteuerte Ausschleusung von Natrium-Fluoreszein beschrieben. Die Position des Fluoreszeins während des Trennprozesses kann kontinuierlich von einem Beobachter mit einer geeigneten optischen Vorrichtung verfolgt werden. Sobald sich die Fluoreszein-Bande an der Ausschleusungsstelle befindet, wird manuell ein Schaltvorgang ausgelöst, der zum Ausschleusen führt. Jedoch könnten selbst bei Automatisierung dieses Systems lediglich farbige oder fluoreszierende Substanzen detektiert und gezielt ausgeschleust werden. Dies bedeutet eine starke Einschränkung.

Andere Detektorsysteme für Ausschleusevorrichtungen konnten bislang nicht direkt in miniaturisierte, planare Analysensysteme integriert werden, so daß die Detektion und Separierung von Substanzen meist nach deren Austritt aus dem Analysensystem erfolgt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, für miniaturisierte planare Analysensysteme eine Vorrichtung zum Ausschleusen von Substanzen bereitzustellen, die direkt in die Analysensysteme integriert ist und aktiv gesteuert werden kann. Bevorzugterweise sollte die Vorrichtung zum Ausschleusen mit Detektionsvorrichtungen kombinierbar sein, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen; somit wäre das Ausschleusen von Analyten vielseitig anwendbar.

Für planare Vorrichtungen für elektrophoretische Trennverfahren wurde eine Anordnung umfassend zumindestens drei Transportelektroden, eine Detektionsvorrichtung und eine Schaltvorrichtung gefunden, die es erlaubt, gezielt Fraktionen während des Trennvorgangs auszuschleusen. In bevorzugten Ausführungsformen ist die Detektionsvorrichtung als elektrische Leitfähigkeits- Impedanz- oder Potentialmeßvorrichtung ausgebildet.

10 Gegenstand der Erfindung ist daher eine Vorrichtung zum Ausschleusen von Fraktionen einer Probe für planare mikrostrukturierte Analysensysteme, die im wesentlichen aus einem Kanalsystem mit mindestens einer Y-Verzweigung, mindestens drei Transportelektroden und mindestens einer Detektionsvorrichtung vor besagter Verzweigungsstelle des Kanalsystems und einer elektrischen Schaltvorrichtung bestehen.

Bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist eine Vorrichtung zum Ausschleusen, in der die Detektionsvorrichtung ein elektrochemischer Detektor ist.

20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin die Verwendung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in einem planaren mikrostrukturierten Analysensystem.

25 Abbildung 1 zeigt beispielhaft eine X-Kreuzung (X) und eine Y-Verzweigung (Y) eines Kanalsystems entsprechend dem Stand der Technik.

Abbildung 2 veranschaulicht das Prinzip der Ausschleusung mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

30

Abbildung 3 und 4 zeigen schematisch Analysensysteme, in die eine erfindungsgemäße Vorrichtung zum Ausschleusen von Substanzen integriert ist.

5 Analysensysteme, in die eine erfindungsgemäße Vorrichtung zum
Ausschleusen von Substanzen integriert werden kann, sind planare
mikrostrukturierte Systeme, die zur Auftrennung von Substanzen dienen.
Derartige überwiegend zweidimensionale Analysensysteme, bieten durch
ihre geringe Größe und einfache Herstellung viele Vorteile gegenüber
10 makroskopischen Analysensystemen. Die Analysensysteme können
zusätzliche Analysevorrichtungen oder Vorrichtungen zur mikro-
präparativen Derivatisierung beinhalten. Durch die Möglichkeit, Detektoren
bzw. eine erfindungsgemäße Vorrichtung zum Ausschleusen schon bei der
Herstellung von Analysensystemen direkt in diese Systeme zu integrieren,
15 können Substanzen schon während oder nach der Trennung in dem
Analysensystem analysiert und separiert werden. Beispielsweise in
Analysensysteme, in denen Substanzen nicht nur getrennt und analysiert
werden, sondern auch weiteren z.B. Derivatisierungsschritten unterzogen
werden, können auch mehr als eine erfindungsgemäße Vorrichtung zum
20 Ausschleusen integriert werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zum Ausschleusen besteht aus einem
Detektorsystem, das ein Kanalsegment direkt vor dem Ausschleusungs-
kanal analysiert, und einem verzweigten Kanalsystem mit entsprechenden
25 Transporte Elektroden. Sobald der Detektor anzeigt, daß sich der
gewünschte Analyt kurz vor der Abzweigung befindet, werden die
Transportelektroden an den Enden der Kanäle umgeschaltet. Der weitere
Transport erfolgt nicht mehr entlang des Trennkanals sondern in den
abzweigenden Ausschleusungskanal. Dieser Vorgang wird beendet, wenn
30 der Detektor anzeigt, daß die Analytbande die Ausschleusungsstelle
passiert hat. Auf diese Weise lassen sich definierte Teile einer Probe
präzise vom Rest der Probe trennen.

Der Vorgang des Ausschleusens umfaßt demnach folgende Schritte:

- Die räumlich aufgetrennte Probe wird durch entsprechende elektrische Spannung zu einer Verzweigungsstelle transportiert.
- 5 • Ein Detektor, der dicht vor der Verzweigungsstelle sitzt, mißt die vorbeiströmenden Komponenten oder eine Markersubstanz, die jeweils den Anfang und das Ende eines auszuschleusenden Bereichs kennzeichnet.
- 10 • Sobald die gewünschte Komponente detektiert wird, werden die Spannungen so umgeschaltet, daß der Fluß in den abzweigenden Kanal gelenkt wird.
- Nachdem die gewünschte Komponente den Detektor passiert hat, wird die Spannung zurückgeschaltet.

15 Auf diese Weise ist nun ein Teil der Probe räumlich vom Rest der Probe getrennt.

Die Steuerung des gesamten Vorgangs, besonders das Umschalten der Potentiale zwischen den Elektroden, erfolgt bevorzugt mittels einer elektronischen Schaltvorrichtung. Derartige Vorrichtungen und deren Anwendung sind dem Fachmann bekannt. Die abgetrennten Substanzen können anschließend innerhalb des Analysensystems weiterführenden Schritten, wie gesonderten Analysen, Derivatisierungen etc. unterzogen werden. Weiterhin können sie auch gezielt aus dem Kanalsystem des Analysensystems entnommen werden. Dazu wird das Kanalsystem mit 25 zusätzlichen Ausgängen versehen. Diese Ausgänge befinden sich vorzugsweise in den Ausschleusungskanälen und werden mittels eines Fluidikanschlusses, wie einer dichtschießenden Pumpe oder Pumpen und Ventilen, abgeschlossen. Typischerweise schließt sich direkt eine Kapillare an, über die die abgetrennte Fraktion in weitere Behältnisse oder Geräte 30 außerhalb des Analysensystems überführt werden kann. Befindet sich demnach eine separierte Fraktion in einem Ausschleusungskanal, so kann

sie hydromechanisch, beispielsweise elektroosmotisch oder mittels Mikropumpen, aus einem Ausgang heraus aus dem Analysensystem entfernt werden.

5 Bei der ausgeschleusten Fraktion kann es sich sowohl um einen störenden Bestandteil handeln, der abgesondert werden soll, damit der Rest der Probe weiter untersucht werden kann, als auch um eine Fraktion, die von dem Rest der Probe getrennt weiteren Analyse- oder Derivatisierungsschritten unterzogen werden soll. Die so zu analysierenden und
10 separierenden Probenbestandteile können ionisch gelöst, emulgiert, suspendiert, kolloidal oder biologisch zellulär in vorwiegend wässriger Lösung vorliegen.

Basis der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist ein auf dem zwei-
15 dimensionalen Analysensystem befindlicher Detektor. Da miniaturisierte Analysensysteme je nach ihrer konkreten Anwendung sehr unterschiedlich strukturiert sein können, muß der Detektor an beliebigen Stellen des Analysensystems positionierbar sein. Für die erfindungsgemäße Vorrichtung können sowohl Detektoren eingesetzt werden, deren
20 maßgeblichste Teile integriert werden können, wie

- Leitfähigkeitsdetektoren (kapazitive, induktive, ohmsche Messung),
- elektrochemische Detektoren (z.B. Amperometrie, ISFET),
- elektrische Temperaturmessung,

aber auch externe Detektoren, bei denen nur Teile, z.B. Linsen oder
25 Faseroptik, in das Analysensystem integriert werden, wie

- optische Detektoren (z.B. Brechungsindex, Temperatur, Absorption, Fluoreszenz, Raman, Lumineszenz)
- NMR
- radioaktives Labeling
- 30 - magnetisches Labeling

Als Detektorvorrichtung werden erfindungsgemäß bevorzugt Leitfähigkeitsdetektoren und optische Detektoren eingesetzt. Für optische Detektoren

kann beispielsweise eine Aufnahmevorrichtung für Lichtleitfaseroptik integriert werden.

5 Für Analysensysteme, in denen Substanzen elektrophoretisch aufgetrennt werden, wird die Forderung einer universellen Detektionsmethode besonders gut von elektrischen Detektionsmethoden wie der Leitfähigkeitsmessung erfüllt. Die Charakterisierung der Analyte erfolgt dabei über deren spezielle elektrische Leitfähigkeit. Eine bestimmte Substanz generiert in einem gegebenen Elektrolytsystem immer die gleiche relative Leitfähigkeit.

10 Dies gilt für aufeinander folgende Messungen in einem miniaturisiertem Analysensystem und auch für Messungen, die in mehreren miniaturisierten Analysensystemen eines Bautyps erfolgen.

15 Bevorzugt wird in der erfindungsgemäßen Vorrichtung daher eine elektrische Leitfähigkeitsmessung verwendet, die im Falle von direkt kontaktierenden Elektroden den elektrischen Strom oder den elektrischen Spannungsabfall erfaßt oder aber im Falle von galvanisch entkoppelten Elektroden über die Messung des dielektrischen Widerstandes erfolgt.

20 Zur Integration eines Leitfähigkeitsdetektors in einem zweidimensionalen Analysensystem müssen Leitfähigkeitselektroden an beliebigen Stellen des Systems, vor allem kurz vor Abzweigungen entlang des Kanalsystems, integriert werden. Dies ist nur durch eine besondere Art des Aufbaus eines solchen Systems möglich. Zum einen muß das Kanalsystem gas- und

25 flüssigkeitsdicht verschlossen sein, zum anderen muß gewährleistet werden, daß chemisch inerte Elektroden präzise und reproduzierbar an den gewünschten Positionen angebracht werden können.

30 Nur durch spezielle Techniken zur Herstellung zweidimensionaler Analysensysteme können die obengenannten Anforderungen erfüllt werden. Die erfindungsgemäßen Systeme bestehen typischerweise aus mindestens zwei Bauteilen, einem Deckel, der mit den Elektroden versehen

ist, und einem mikrostrukturierten Substrat. Nach Produktion der Bauteile werden diese durch ein spezielles Bonding-Verfahren zusammengefügt. Auf diese Weise ist es möglich, die erfindungsgemäße Ausschleusevorrichtung in planare Analysensysteme zu integrieren.

5

Die Bauteile der Systeme bestehen bevorzugt aus kommerziell erhältlichen thermoplastischen Kunststoffen, wie PMMA (Polymethylmethacrylat), PC (Polycarbonat) oder PMP (Polymethylpenten), cycloolefinischen Copolymeren oder duroplastischen Kunststoffen, wie beispielsweise Epoxidharzen. Bevorzugterweise bestehen alle Bauteile eines Systems aus demselben Material.

10

Die Bauteile können nach dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt werden. Bauteile, die Mikrostrukturen enthalten, können beispielsweise durch etablierte Verfahren, wie Heißprägen, Spritzguß oder Reaktionsguß, produziert werden. Besonders bevorzugt werden Bauteile eingesetzt, die nach bekannten Techniken zur Massenproduktion vervielfältigt werden können. Mikrostrukturierte Bauteile können Kanalstrukturen mit Querschnittsflächen zwischen 10 und 250000 μm^2 besitzen. Für die erfindungsgemäße Ausschleusevorrichtung muß das Kanalsystem neben Bereichen zur Probenaufgabe und einem Trennkanal mindestens eine von einem Trennkanal ausgehende X- oder Y-Verzweigung aufweisen. Zur Integration mehrerer Ausschleusungsvorrichtungen können an beliebigen Stellen des Kanalsystems weitere Verzweigungen eingeführt werden.

15

20

25

Die Elektroden, die für die erfindungsgemäße Ausschleusevorrichtung benötigt werden, sind Transportelektroden, die sich an den Enden der verzweigten Kanäle befinden und ein Umschalten des Potentials zwischen den beiden Kanälen ermöglichen, sowie Detektionselektroden, die bevorzugt zwischen 40 mm und 0,1 μm vor der Abzweigung positioniert sind.

30

Zur Integration der Elektroden in das Analysensystem bzw. die erfindungsgemäße Vorrichtung, werden die Elektroden bevorzugt an einem Bauteil des Systems, dem Deckel angebracht. Sie müssen dazu eine hinreichende Haftfestigkeit auf dem Kunststoffbauteil aufweisen. Dies ist sowohl für das Zusammenfügen der einzelnen Bauteile als auch für die späteren Einsatz der Analysensysteme von Bedeutung. Werden bei der Verbindung der Bauteile z.B. Klebstoffe eingesetzt, darf der Klebstoff die Elektrode nicht von der Kunststoffoberfläche ablösen. Weiterhin sollten die Elektroden aus chemisch inerten Materialien, wie z.B. Edelmetallen (Platin, Gold) bestehen.

Die Metallisierung von Kunststoffoberflächen erfolgt typischerweise durch elektrochemisches Abscheiden von Metallen aus Metallsalzlösungen. Hierfür ist es allgemein üblich, in einem mehrstufigen Prozeß zunächst die Kunststoffoberfläche chemisch oder mechanisch vorzubehandeln, einen diskontinuierlichen Primer aufzubringen und abschließend die elektrochemische Abscheidung durchzuführen. Beschreibungen dieser Metallisierungstechniken finden sich z.B. in US 4,590,115, EP 0 414 097, EP 0 417 037 und bei Wolf und Gieseke (G.D. Wolf, H. Gieseke, „Neues Verfahren zur ganzflächigen und partiellen Metallisierung von Kunststoffen,“ *Galvanotechnik* 84, 2218-2226, 1993). Den naßchemischen Verfahren gemeinsam ist, daß relativ aufwendige Vorbehandlungsprozesse notwendig sind, um ausreichende Haftfestigkeiten zu erreichen.

In DE 196 02 659 wird das haftfeste Aufbringen von Kupfer auf mehrphasige Polymermischungen mittels Aufdampfen oder Sputtern beschrieben. Als Ursache der guten Haftung wird die Zusammensetzung der Polymermischungen genannt. Demnach müssen die Mischungen Polyarylsulfide, Polyimide oder einen aromatischen Polyester enthalten.

Der Einfluß von Plasmavorbehandlungen zur Erzielung besserer Hafteigenschaften von Metallen auf Kunststoffoberflächen wird von

Friedrich (J. Friedrich, „Plasmabehandlung von Polymeren“, *kleben & dichten* 41, 28-33, 1997) am Beispiel verschiedener kommerziell erhältlicher Thermoplaste zusammengefaßt.

5 Besonders bevorzugt werden die Elektrodenstrukturen auf den Kunststoffbauteilen mittels einer neuartigen Zwei-Schicht-Technik erzeugt. Dazu wird zunächst eine haftvermittelnde Schicht aus Chromoxid erzeugt. Im Gegensatz zu Edelmetallen zeigt Chromoxid hervorragende Hafteigenschaften auf Kunststoffoberflächen. Zudem ist Chromoxid im Gegensatz zu
10 elementarem Chrom und anderen Übergangsmetallen wesentlich beständiger gegenüber Redoxprozessen. Auf die Haftschrift aus Chromoxid wird dann das Edelmetall, wie beispielsweise Platin oder dessen Legierungen oder Gold, aufgetragen.

15 Das selektive Aufbringen von Chromoxid und der darauf abzuschcheidenden Edelmetallschicht auf Kunststoffsubstraten erfolgt bevorzugt im lift-off-Verfahren oder mittels der Schattenmaskentechnik oder der Strukturierung von zunächst ganzflächig aufgetragenen metallischen Schichten. Diese Verfahrenstechniken sind Standardprozesse der Mikrostrukturtechnik. Im
20 folgenden werden die für die Zwei-Schicht-Technik erforderlichen Arbeitsschritte für die genannten Verfahren kurz beschrieben.

Lift-off-Verfahren: Das selektiv zu metallisierende Kunststoffbauteil wird mit einem Photolack beschichtet. Dieser Photolack darf dabei das zu
25 metallisierende Kunststoffteil nicht bzw. nur leicht anlösen. Für PMMA hat sich z.B. ein Photolack der Firma Allresist, Berlin (AR 5300/8) als geeignet erwiesen. Nach Belichtung und Entwicklung der zu metallisierenden Strukturen erfolgt das Aufbringen der metallischen Schichten in einer Sputteranlage. Das Aufbringen der Chromoxidschicht erfolgt während des
30 Sputterprozesses durch das Einleiten von Sauerstoff in das typischerweise verwendete Argon-Plasma der Sputteranlage. Als Sputtertarget wird ein konventionelles Chrom-Target verwendet. Typische Chromoxid-

Schichtdicken sind 20-50 nm. Alternativ kann direkt ein Chromoxid-Target eingesetzt werden. Das Sputtern von Platin bzw. dessen Legierungen oder von Gold wird direkt anschließend unter Standardbedingungen, d.h. im Argon-Plasma, durchgeführt. In dem eigentlichen lift-off-Prozeß wird der noch vorhandene Photolack und mit diesem die auf dem Lack befindliche Metallschicht in einem Entwickler der Firma Allresist (AR 300-26) von dem Kunststoffbauteil abgelöst.

Schattenmaskentechnik: Das selektiv zu metallisierende Kunststoffteil wird mit einer sogenannten Schattenmaske abgedeckt. Diese hat an den zu metallisierenden Bereichen Aussparungen. Durch diese hindurch werden die Metallschichten in Analogie zum lift-off-Verfahren aufgesputtert.

Strukturierung flächiger metallischer Schichten: Auf einem selektiv zu metallisierenden Kunststoffteil wird zunächst ganzflächig eine Metallschicht in Analogie zum bereits beschriebenen Sputterprozeß aufgebracht. Diese wird in nachfolgenden Prozeßschritten, entweder durch selektiven Abtrag mittels z.B. Laserablation (Gold und Platin) oder z.B. durch selektives naßchemisches Ätzen, strukturiert. Zur Strukturierung mittels naßchemischem Ätzen wird auf die Metallschicht zunächst ein Photolack (Hoechst AG, Deutschland; AZ 5214) aufgebracht, belichtet und entwickelt. Gold wird dann in Cyanid-Lösung in den belichteten Bereichen abgelöst.

Die Haftfestigkeit von mit Chrom als auch mit Chromoxid als Haftschrift mittels Sputtertechnik hergestellten Elektroden wurde mit Hilfe von Abreißtests überprüft. Die Haftfestigkeit der Chromoxidschichten ist deutlich größer. Auch bei Ultraschallbehandlung in alkalischer Lösung sind die Metallschichten, welche mit Chromoxid als Haftschrift hergestellt wurden, verglichen mit Metallschichten, die mit Chrom als Haftschrift hergestellt wurden, deutlich beständiger.

Nach Produktion und Vorbereitung der einzelnen Bauteile werden diese zusammengefügt. Bevorzugterweise ist ein Bauteil, das Substrat, mikrostrukturiert und mit rückseitigen Bohrungen zum Befüllen der Kanäle und/oder Kontaktieren der Elektroden versehen. Desweiteren hat sich auch

5 die Verwendung einer sogenannten Dichtlippe, d.h. einer die Kanalstrukturen vollständig umschließenden Erhebung auf den Substraten mit Höhen zwischen typischerweise 0,5 bis 5 μm , hinsichtlich des Verklebeprozesses als sehr vorteilhaft erwiesen. Das andere Bauteil, der Deckel, dient zur Abdeckung und ist z.B. bei elektrophoretischen Analysen-

10 systemen mit den Elektroden versehen. In diesem Fall wird der Deckel erfindungsgemäß als Elektrodendeckel bezeichnet. Zum Zusammenfügen der Bauteile wird bevorzugt zunächst auf das mikrostrukturierte Bauteil an den Stellen, an denen keine Strukturierung vorliegt, ein Klebstoff aufgebracht. Die Schichtdicke beträgt bevorzugterweise nicht mehr als 0,5

15 bis 10 μm . Typischerweise erfolgt die Auftragung mittels einem aus der Drucktechnik bekannten flächigen Walzenautrag. Der verwendete Klebstoff darf die Oberfläche der Bauteile nicht oder nur sehr schwach anlösen, damit die Elektroden beim Verklebungsprozeß nicht vom Klebstoff abgelöst oder unterbrochen werden. Bevorzugterweise wird daher als Klebstoff das

20 Produkt NOA 72, Thiolacrylat der Firma Norland, New Brunswick, NJ 08902 USA, verwendet. Dieser Kleber wird photochemisch ausgehärtet. Es können jedoch für das Verfahren auch andere Arten von Klebern verwendet werden, die die oben genannten Voraussetzungen erfüllen.

25 Nach dem Aufbringen des Klebstoffs wird das zweite Bauteil mit den Dünnschichtelektroden beispielsweise auf einer Belichtungsmaschine zu dem Substrat geeignet positioniert und aufgepreßt. Bevorzugt ist die Verwendung von starken Glasplatten als Preßfläche, so daß direkt die photochemische Härtung des Klebers durch Bestrahlung mit einer Hg-

30 Lampe (Emissionswellenlänge 366 nm) durchgeführt werden kann.

Die Positionierung des Deckels auf dem Substrat kann für den Klebevorgang typischerweise visuell unter manueller Kontrolle, passiv mechanisch mit Hilfe einer Einrastvorrichtung, optisch mechanisch unter Zuhilfenahme von optischen Justagemarken oder elektrisch mechanisch mit Hilfe von elektrischen Marken (Kontakten) erfolgen.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird das mit den Elektroden versehene Bauteil auf den Bereichen, die beim Zusammensetzen der beiden Bauteile nicht über einem Kanal liegen oder elektrisch kontaktiert werden müssen, mit dem Kleber benetzt. Hierfür wird beispielsweise ein in der Drucktechnik bekanntes Verfahren (Tampondruck) verwendet. Das Bauteil mit den Kanalstrukturen wird anschließend geeignet zu seinem Gegenstück positioniert und aufgepreßt. Die Aushärtung erfolgt wie oben beschrieben.

Kontaktierung der Transport- und Detektionselektroden sowie die automatische Regelung und das Umschalten des elektrischen Flusses erfolgen nach dem Fachmann bekannten Methoden.

Auf diese Weise können Transport- und Detektionselektroden derart in die mikrostrukturierten Analysensysteme integriert werden, daß eine oder mehrere erfindungsgemäße Ausschleusevorrichtungen erzeugt werden. Die Integration der Ausschleusevorrichtungen erfordert weder zusätzlichen Aufwand noch wird die Qualität (Stabilität, Größe etc.) der Analysensysteme beeinflusst.

Somit stellt die erfindungsgemäße Vorrichtung eine wichtige zusätzliche Funktionalität für planare mikrostrukturierte Analysensysteme dar. Sie ermöglicht erstmals das Design multifunktionaler mikrostrukturierter Analysensysteme. Die Systeme sind nicht nur in der Lage, Proben aufzutrennen, sie können vielmehr Proben trennen, identifizieren und selektieren, ohne daß die Probe das Analysensystem verläßt. Dies eröffnet

auch die Möglichkeit, lediglich bestimmte Probenbestandteile nach der Ausschleusung aus dem Analysensystem auszuführen, oder diese im System weiteren Derivatisierungs- oder Analyseschritten zu unterwerfen.

5 Durch die beschriebenen Herstellverfahren der Elektroden und Bondingverfahren können erstmals geschlossenen Mikrokanalstrukturen erzeugt werden, in denen Elektroden an beliebigen Stellen innerhalb der Kanäle positioniert werden können. Strukturierte Bauteile (Substrate) können flüssigkeits- und gasdicht mit beispielsweise Elektrodendeckeln
10 versehen werden. Durch die Verwendung zumeist kommerziell erhältlicher Kunststoffe und einfacher Verarbeitungsschritte können derartige Analysensysteme kostengünstig und in großen Zahlen produziert werden. Sie erfüllen alle Anforderungen, die an ein variabel einsetzbares, genau arbeitendes Analysensystem gestellt werden müssen:

- 15
- Sie zeigen hohe Dimensions- und Volumenstabilität der Kanäle.
 - Durch die Festigkeit der Klebeverbindungen sind sie im Inneren der Kanäle druckstabil.
 - Es besteht eine große Variabilität bezüglich der verwendbaren Kunststoffe.
- 20
- Es können chemisch inerte Materialien für Bauteile und Elektroden verwendet werden.
 - Alle vier Kanalwände bestehen bevorzugt aus dem gleichen Material.
 - Die Elektroden sind auf $\pm 10 \mu\text{m}$ genau an beliebigen Stellen der Kanäle positionierbar.
- 25
- Die Kontaktflächen der Elektroden sind frei von Verunreinigungen durch Klebstoff.
 - Die Elektroden können leicht angeschlossen werden.
 - Die Systeme zeigen geringen Innenwiderstand und erlauben potentiell
- 30
- hohe Stromdichten.

Abbildung 2 veranschaulicht das Ausschleusen einer Substanz mithilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Es werden drei verschiedene Stadien des Ausschleusens in den Bildern A, B und C gezeigt. Die schematisierte Ausschleusungsvorrichtung besteht aus einem Y-verzweigten Kanalsystem mit den Transportelektroden 1, 2 und 3 an den Enden der Kanäle. Das Kanalstück zwischen Elektrode 1 und 2 dient als Trennkanal, der zu Elektrode 3 abzweigende Kanal ist der Ausschleusungskanal. Kurz vor Abzweigung des Ausschleusungskanals befindet sich im Trennkanal eine Detektorelektrode 4. In Bild A wandern die zu trennenden Substanzen 5 und 6 aufgrund eines Potentials zwischen den Elektroden 1 und 2 entlang des Trennkanals. Bild B zeigt den Moment, in dem die gesuchte Substanz 5 die Detektorelektrode passiert. Das detektierte Signal, beispielsweise die spezifische relative Leitfähigkeit, bewirkt ein Umschalten des Potentials, so daß nun ein Potential zwischen Elektrode 1 und 3 besteht. Dadurch wandert, wie in Bild C gezeigt, Substanz 5 in den Ausschleusekanal und wird so von Substanz 6, die sich im Trennkanal befindet, separiert. Nachdem Substanz 5 den Detektorbereich passiert hat und in den Ausschleusungskanal gewandert ist, kann das Potential erneut umgeschaltet werden, damit keine weiteren Substanzen in den Ausschleusungskanal gelangen.

Abbildung 3 zeigt schematisch ein Beispiel eines miniaturisierten planaren Analysensystems mit integrierter erfindungsgemäßer Vorrichtung zum Ausschleusen von Proben. Das System enthält einen Trennkanal T1 mit zwei Transport- bzw. Leistungselektroden E3 und E5 an den Enden und zwei Detektionselektroden E1 und E2 kurz vor der Verzweigungsstelle V des Kanalsystems. An der Verzweigungsstelle V zweigt ein Kanal ab, der sich wiederum dreifach verzweigt. An den Enden befinden sich ein Reservoir P, ein Mischungsreaktor R und ein weiteres Reservoir mit einer Leistungselektrode E4. Wird nun ein Substanzgemisch entlang des Trennkanals T1 aufgetrennt, kann mithilfe der Detektionselektroden E1 und E2 festgestellt werden, wann die gewünschte Probensubstanz an die

Verzweigungsstelle V des Kanalsystems gelangt. In diesem Moment wird das Potential umgeschaltet, so daß nun eine Potentialdifferenz zwischen E5 und E4 besteht. Dadurch wandert die ausgewählte Substanz in die Abzweigung des Kanalsystems. Nachdem die Detektionselektroden E1 und E2 anzeigen, daß die Substanz die Verzweigungsstelle passiert hat, kann das Potential erneut umgeschaltet werden. Die in die Abzweigung abgesonderte Substanz kann nun mechanisch durch einen Flüssigkeitsstrom aus dem Reservoir bei E4 in den Mischungsreaktor R transportiert werden. Zusätzlich können durch einen ähnlichen Flüssigkeitsstrom ausgehend von dem Reservoir P parallel weitere Substanzen, z.B. Reaktanden zur Derivatisierung, in den Mischungsreaktor geleitet werden, wo sie sich mit der Probensubstanz mischen und gegebenenfalls mit dieser reagieren.

Abbildung 4 zeigt schematisch ein Beispiel eines miniaturisierten planaren Analysensystems mit integrierter erfindungsgemäßer Vorrichtung zum Ausschleusen von Proben, einer Vorrichtung zur Aufgabe definierter Probenvolumina und einem Trennkanal. Ein solches Analysensystem bietet die Möglichkeit, ein definiertes großes Probenvolumen aufzugeben, dieses beispielsweise mittels ITP aufzutrennen, durch die erfindungsgemäße Ausschleusevorrichtung eine bestimmte Fraktion der Probe zu separieren und optional die abgetrennte Fraktion oder den Rest der Probe erneut aufzutrennen und zu analysieren oder aus dem System zu entfernen. Die Vorrichtung zur Probenaufgabe besteht aus den Kanalabschnitten K1 und K2, die von den Fluidikanschlüssen F1 und F2 bzw. F2 und F3 begrenzt werden. Als Fluidikanschlüsse dienen typischerweise dichtschießende Mikropumpen oder Mikropumpen und Ventile. Das Volumen des Kanalabschnitts K1 beträgt typischerweise 5 oder 10 μl , das des Kanalabschnitts K2 0,5 oder 1 μl . Durch Öffnen des Fluidikanschlusses F2 und gleichzeitiges Befüllen des Kanalabschnitts K1 mit der Probenlösung über den Fluidikanschluß F1 wird ein durch das Volumen von K1

bestimmtes definiertes Volumen der Probe in das Kanalsystem gefüllt. Ein größeres Volumen kann aufgegeben werden, wenn statt des Fluidikanschlusses F2 der Fluidikanschluß F3 geöffnet wird. Dann ergibt sich das aufgegebene Volumen der Probe aus der Summe der Volumina der

5 Kanalabschnitte K1 und K2. Soll das Volumen der aufgegebenen Probe dagegen kleiner sein, wird durch Öffnen der Fluidikanschlüsse F2 und F3 lediglich der Kanalabschnitt K2 befüllt. Durch Variation der Größe der Kanalabschnitte K1 und K2 oder auch durch Hinzufügen weiterer mit Fluidikanschlüssen begrenzter Kanalabschnitte kann so das Aufgabevolumen variiert und an die entsprechenden Anforderungen der Probe

10 angepasst werden. Die Auftrennung der Probe erfolgt in dem sich anschließenden Kanalsystem (K3, K4, K5). Dazu befinden sich an den Enden des gesamten Kanalsystems, d.h. anschließend an K1, K4 und K5 jeweils Flüssigkeits- oder Pufferreservoirs R1, R2 und R3 sowie

15 Leistungselektroden L1, L2 und L3. Die Pufferreservoirs können über die Fluidikanschlüsse F1, F4 bzw. F5 befüllt werden. Falls lediglich Kanalabschnitt K1 zur Probenaufgabe verwendet wird, kann zusätzlich Kanalabschnitt K2 zur Verlängerung der Trennstrecke eingesetzt werden. Die Trennung der Probe kann z.B. bei rein analytischen Fragestellungen über

20 Kanalabschnitt K3 bis zu Kanalabschnitt K5 ausgedehnt werden. Die Detektion erfolgt dann mittels der kurz vor R3 angebrachten Detektionselektroden D3 und D4. Soll eine Fraktion der Probe von dem Rest getrennt werden, wird die erfindungsgemäße Vorrichtung zum Ausschleusen verwendet. Diese wird gebildet durch den Trennkanal-

25 abschnitt K3, die Verzweigungsstelle Vz, die beiden abzweigenden Kanalabschnitte K4 und K5, die vor der Verzweigungsstelle Vz befindlichen Detektionselektroden D1 und D2 sowie durch eine nicht in der Abbildung dargestellte Schaltvorrichtung zur Steuerung der Leistungselektroden. Sobald die gewünschte Fraktion während der Trennung die Detektions-

30 elektroden D1 und D2 passiert, kann das Potential der Leistungselektroden L1, L2 und L3 entsprechend modifiziert werden. Falls zunächst der Transport von L3 zu L2 erfolgte, kann die Fraktion durch Umschalten auf

eine Potentialdifferenz zwischen L3 und L1 an der Verzweigungsstelle Vz in den Kanal K4 ausgeschleust werden. Nachdem die Fraktion Vz passiert hat, wird durch erneutes Umschalten der Rest der Probe wieder in K5 transportiert. Die ausgeschleuste Fraktion kann dann über den Fluidik-
5 anschuß F4 aus dem Analysensystem entnommen werden. Der in K5 verbliebene Rest der Probe kann über die Detektionselektroden D3 und D4 erneut analysiert werden. Genauso kann die auszuschleusende Fraktion durch andere Schaltung der Leistungselektroden an Vz in Kanalabschnitt K5 ausgeschleust werden, während der Rest der Probe in Kanalabschnitt 4
10 transportiert wird. In diesem Fall kann die ausgeschleuste Fraktion an D3/D4 erneut detektiert werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, das Kanalsystem mit zwei unterschiedlichen Puffersystemen zu befüllen und so zwei unterschiedliche Trennungen direkt hintereinander durchzuführen. Dazu werden die Kanalabschnitte K3 und optional zusätzlich K2 mit dem
15 ersten Puffersystem gefüllt. Ab der Verzweigungsstelle Vz werden die Kanalabschnitte K4 und K5 mit dem zweiten Puffersystem befüllt. Die erste Trennung erfolgt entlang K2/K3. An Vz kann dann eine Fraktion der Probe in Kanalabschnitt K5 ausgeschleust werden oder auch die gesamte Probe in diesen Kanalabschnitt überführt werden. Sobald die Probe diesen
20 Kanalabschnitt mit dem anderen Puffersystem erreicht, erfolgt dann die zweite Trennung. Die Kontrolle der beiden Trennungen erfolgt über die Detektionselektroden D1 und D2 für die erste Trennung und das optionale Ausschleusen, sowie mit D1/D2 für die Kontrolle der zweiten Trennung. Auf diese Weise können z.B. eine isotachophoretische Trennung und eine
25 elektrophoretische Trennung oder auch zwei isotachophoretische Trennungen kombiniert werden.

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fach-
30 mann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als

beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

5 Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten
Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen sind durch Bezugnahme in
diese Anmeldung eingeführt.

10

15

20

25

30

Ansprüche

- 5
1. Vorrichtung zum Ausschleusen von Fraktionen für planare mikrostrukturierte Analysensysteme, im wesentlichen bestehend aus einem verzweigten Kanalsystem, mindestens drei Transportelektroden, mindestens einer Detektionsvorrichtung vor einer Verzweigungsstelle des Kanalsystems und einer elektrischen Schaltvorrichtung.
- 10
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionsvorrichtung ein elektrochemischer Detektor ist.
- 15
3. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2 in einem planaren, mikrostrukturierten Analysensystem.
- 20
- 25
- 30

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum Ausschleusen definierter Teile von Proben nach einer präparativen oder analytischen Flüssigphasentrennung in planaren, miniaturisierten Analysensystemen aus dem Trennkanal in einen weiteren Kanal. Durch die Möglichkeit zur Positionierung von Detektoren, wie beispielsweise zur Leitfähigkeitsmessung, an beliebigen Stellen im Analysensystem, kann die Ausschleusevorrichtung direkt in das Analysensystem integriert werden.

10

15

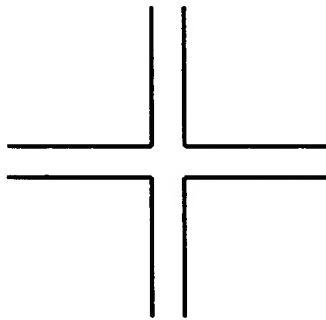
20

25

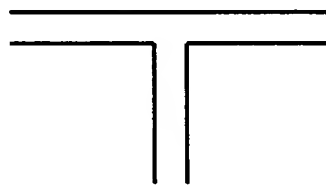
30

1/4

Fig. 1



X

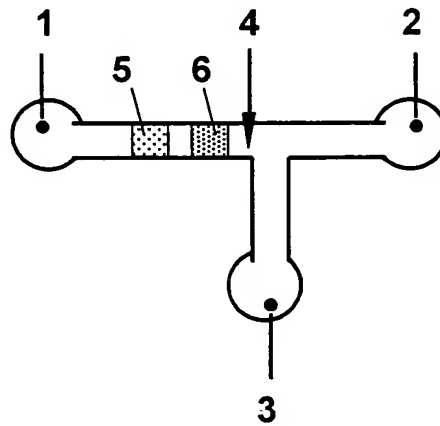


Y

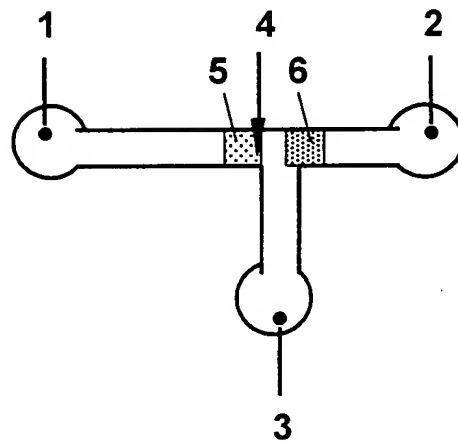
2/4

Fig. 2

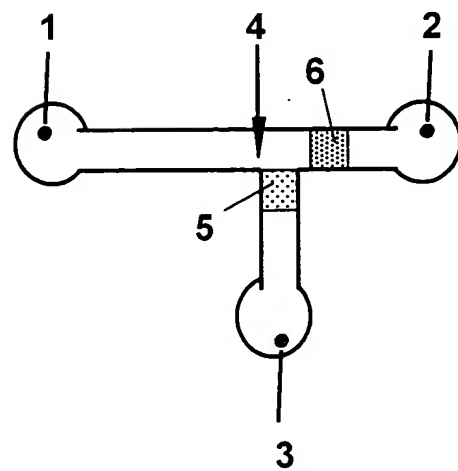
A



B

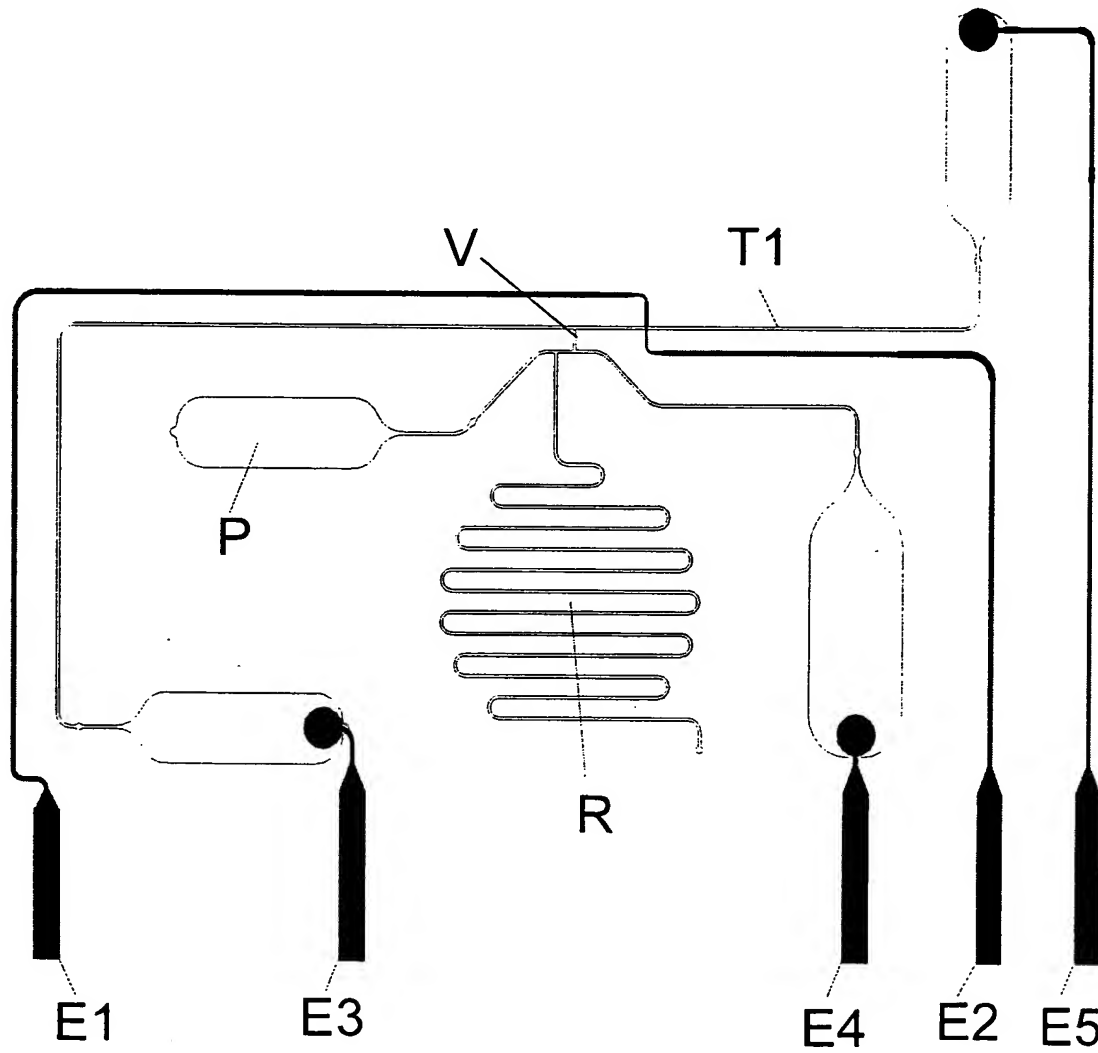


C



3/4

Fig. 3



4/4

Fig. 4

